第21卷 第3期 昆 虫 学 报 Vol. 21, No. 3
1978 年 8 月 ACTA ENTOMOLOGICA SINICA August, 1978

昆虫保幼激素类似物对家蚕丝腺中核酸代谢的效应

吴秋雁 胡召元 郭郛
(中国科学院动物研究所)

摘要 1)保幼激素类似物3号对家蚕后丝腺细胞中 RNA 的合成有促进作用。
2) 家蚕幼虫五龄期,其后丝腺中 DNA 含量是不断地增加的,其含量因品种和饲养条件的不同而有较大的差异。
3) 保幼激素类似物3号对后丝腺细胞中 DNA 的合成有强烈的抑制作用,激素剂量愈高,抑制程度愈大。
4) 我们初步认为,保幼激素类似物3号增产蚕丝的作用是通过调节丝蛋白合成的转录过程而达到的。

应用昆虫保幼激素类似物养蚕增丝,为我国蚕丝的增产开辟了一条新途径。近年来应用这种类似物增产蚕丝先后在广东、江苏、浙江、河北以及北京地区开展,一般可增加茧量15%左右,效果是可观的,潜力也还很大。为了进一步发展昆虫激素在蚕业上的应用,我们进行了蚕丝蛋白的合成和保幼激素的作用机理的研究,这里报道其中部分工作的结果。

家蚕幼虫的生长和发育是由咽侧体分泌的保幼激素和由前胸腺分泌的脱皮激素相互调节控制的。在正常情况下,幼虫到了五龄,虽然初期咽侧体仍然分泌保幼激素,但至五龄后期,其分泌机能逐渐衰退,甚至完全停止分泌;此时前胸腺所分泌的脱皮激素则起主导作用,使幼虫结茧化蛹,如果在五龄期适当时间,人为地增加蚕体中的保幼激素,可以暂时抑制成虫特征的出现而继续保持幼虫的结构特征,即适当延长了五龄龄期,这就为丝蛋白的合成和积累争取了时间。为了介外源保幼激素对蚕丝腺的作用机理,我们对保幼激素类似物在蚕丝腺中对核酸代谢的影响进行了初步的试验和分析。

试验材料与方法

所用家蚕为华合 × 东肥、日东 × 华合和苏$_3$ × 苏$_4$三个品种,所用保幼激素类似物3号(J003)[1-(对乙基苯氧基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-2-辛烯]为本所药剂毒理室合成,所用激素剂量为每头3微克,在幼虫五龄期第三天喷洒处理,另设只喷洒蒸馏水的对照组,幼虫五龄期中每隔一天取蚕解剖后丝腺进行试验。

同位素试验所用标志化合物为 ^{3}H-胸腺嘧啶核苷(比强24居里/毫克分子),为上海原子核研究所产品,幼虫经乙醚麻醉后,从胸腹节间的部位注入 ^{3}H-胸腺嘧啶核苷10微居里/10微升,注射后的幼虫放在室温条件下继续饲养。所用 Bray's 闪烁液由萘30克加入2,5-二苯基噁唑2克,1,4-双[2-(4-甲基-5-苯基噁唑)]-苯0.1克,甲醇50毫升,乙二醇10毫升,最后加二氧六环至500毫升配成。

每次试验取五龄幼虫雌雄各 5 头，分为雌雄两组，称体重后在冰浴中解剖取出后丝腺，将丝腺剪碎后放入匀浆管内，加入 2—3 毫升冰水在冰浴中匀浆，匀浆后加入冰水至10 毫升定容。

核酸分离提取的方法按 Chinzei 等(1972)的方法稍加改良；取上述匀浆 4 毫升，加 4 毫升 0.6*N* 过氯酸离心(3000 转/10 分钟)，弃上清液，沉淀物用 5 毫升 0.3*N* 过氯酸抽提两次，再用 80% 乙醇、乙醇:乙醚(3:1)和乙醚各抽提一次，弃上清液，所得沉淀物加入 4 毫升 0.5*N*过氯酸在 70℃水浴中保温两次，每次 20 分钟以提取核酸，离心后合并两次上清液待测。

DNA 用 Burton (1956)的二苯胺法测定，RNA 用苔黑酚法测定，同位素标志用瑞典产的 LKB-Wallac 8100型液体闪烁仪测定。

试　验　结　果

(一) 保幼激素类似物 3 号对家蚕后丝腺核糖核酸(RNA)含量变化的影响

正常家蚕五龄期幼虫后丝腺中RNA含量是有很大变化的，一般从五龄第一天递增至第七天时平稳，至上簇时或有下降，这因家蚕品种、饲养条件不同而有不同；RNA含量在五龄期中约增加4—5倍，经激素处理后的幼虫头两天，其 RNA 量较正常对照组的略低，三天之后就稍高于对照组，待正常对照组的幼虫上簇后，激素处理组的幼虫其后丝腺的 RNA 含量仍继续增高；1974 年秋蚕试验结果，激素处理组五龄最后一天，后丝腺平均每头含 RNA 为 5.51 毫克，对照组为 4.98 毫克。1975 年春蚕试验结果，激素处理组五龄最后一天，平均每头含 RNA5.00 毫克，对照组为 3.95 毫克；激素处理后 RNA 含量约增加 10—20%。雌雄两性的变化规律基本相同，因此可以看出，激素对后丝腺中 RNA 的合成是有促进作用的(表 1，图 1)，这就为更多的丝蛋白合成提供了物质基础。

表 1　J003 对家蚕后丝腺核糖核酸含量变化的影响

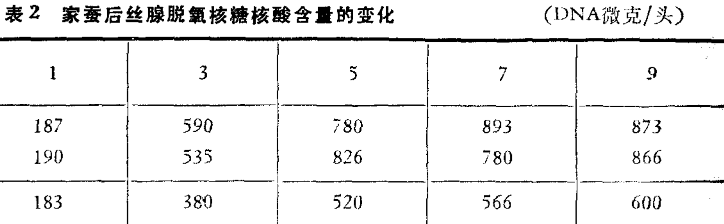
实验日期	五龄发育天数(饷食小时数)	处理组				对照组			
		体重(克)		后丝腺 RNA(毫克)		体重(克)		后丝腺 RNA(毫克)	
		♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
一九七四年秋蚕	一(27)					1.14	1.08	0.74	0.95
	三(74)					1.94	1.80	2.76	2.52
	五(120)	3.34	3.12	3.90	4.00	3.16	3.14	4.40	4.26
	七(168)	3.68	3.66	4.88	5.20	3.42	3.60	4.40	5.08
	九(216)	4.34	3.92	5.52	4.90	4.00	3.64	5.26	4.70
	十一(264)	4.34	3.86	5.63	5.40				
一九七五年春蚕	二(41)					2.32	1.86	1.66	1.42
	三(65)					2.88	2.30	3.25	3.00
	五(113)	4.58	3.88	4.50	4.70	4.14	3.92	5.60	5.20
	七(161)	5.40	4.20	6.30	6.20	4.84	4.20	5.40	4.80
	九(209)	5.10	4.42	4.30	4.40	4.52	4.10	3.70	4.20
	十一(240)	5.04	4.22	5.10	4.90				

家蚕品种：日东×华合。

（二）不同蚕种后丝腺中脱氧核糖核酸（DNA）含量的变化

家蚕幼虫五龄期，后丝腺的 DNA 含量是不断地增加的，至五龄末期增加的量约为五龄初期的三倍，其绝对含量因品种和饲养条件的不同而有差异，从表 2 中可以看出，春蚕

表 2　家蚕后丝腺脱氧核糖核酸含量的变化　　（DNA微克/头）



品种 \ 五龄天数		1	3	5	7	9
华合×东肥	♀	187	590	780	893	873
	♂	190	535	826	780	866
日东×华合	♀	183	380	520	566	600
	♂	226	373	506	580	606

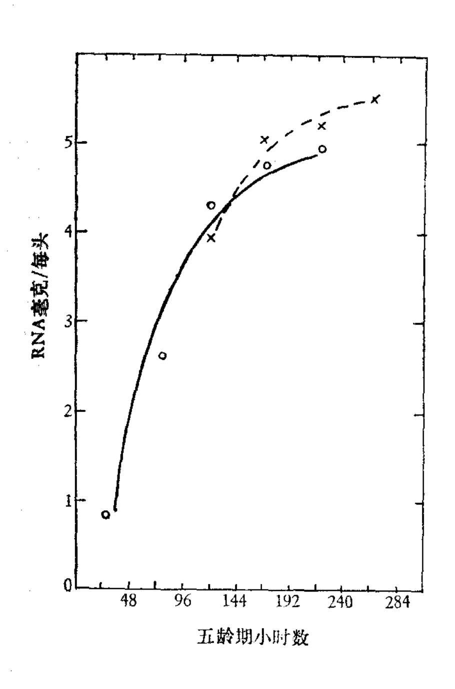


图 1　J003 对后丝腺中 RNA 含量变化的影响
……处理组；　——对照组

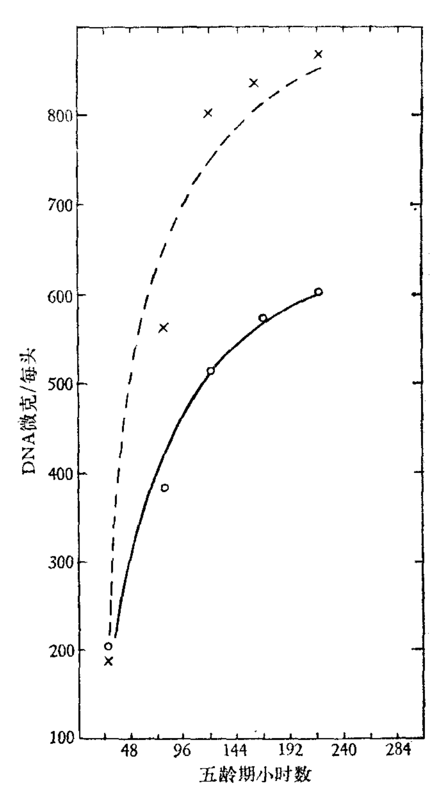


图 2　不同品种家蚕后丝腺 DNA 含量的变化
……华合×东肥（春蚕）；　——日东×华合（秋蚕）

华合 × 东肥品种的 DNA 含量较秋蚕日东 × 华合品种的高，后丝腺 DNA 含量的多少与蚕的生命力和产丝量有一定的关系（图2）。春蚕华合 × 东肥品种的 DNA 含量最高值为 893 微克/头，而秋蚕日东 × 华合品种的最高值仅为 606 微克/头，前者比后者高出 1/4。

（三）保幼激素类似物 3 号对家蚕后丝腺 DNA 合成过程中 ^{3}H-胸腺嘧啶核苷参人的影响

将^{3}H-胸腺嘧啶核苷注射至家蚕幼虫体内后，每隔一定时间，测定总核酸的放射性，从

测定结果可以看出，保幼激素类似物 3 号对后丝腺 DNA 合成过程中 ^{3}H-胸腺嘧啶核苷的参入有强烈的抑制作用，总的情况是激素剂量愈高，抑制程度愈重，如图 3 所示为超过 3 微克/头的实验结果，抑制的效应超过 50% 以上，并且直至幼虫化蛹，参入率始终未能恢复，如按每头 3 微克激素点滴处理，开始时仍然是明显抑制，至化蛹前，^{3}H-胸腺嘧啶核苷对 DNA 的参入量才逐渐恢复到接近正常，这说明保幼激素类似物 3 号对后丝腺中 DNA

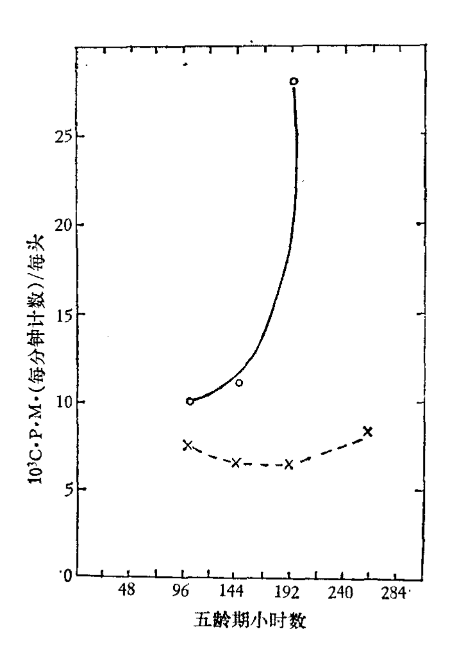


图 3　J003 对 ^{3}H-胸腺嘧啶核苷参入后丝腺 DNA 的影响(剂量为超过 3 微克/头)

——处理组；　——对照组

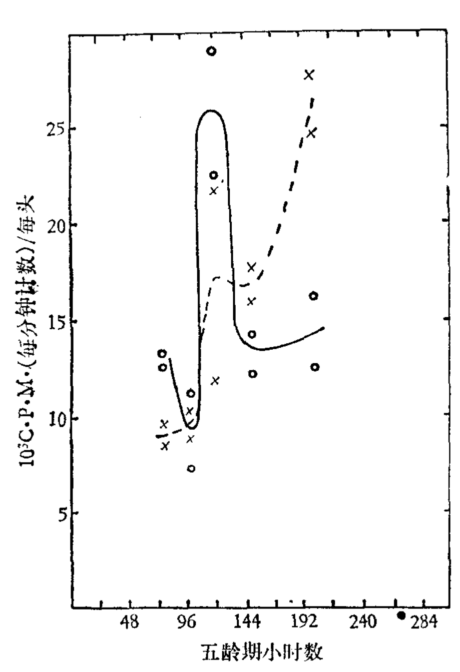


图 4　J003 对 ^{3}H-胸腺嘧啶核苷参入后丝腺 DNA 的影响(剂量为 3 微克/头)

——处理组；　——对照组

的代谢过程是有特殊效应的，它能抑制 DNA 的合成，这一结果进一步证明，保幼激素直接作用于遗传物质(图 4)。

讨　　论

关于家蚕后丝腺合成丝心蛋白和激素的调节，我们有一篇初步的报道和意见，现分别讨论核酸的变化和激素的作用。

1. 关于 RNA　家蚕五龄幼虫的后丝腺在早期发育的过程中有 RNA (包括 rRNA, mRNA 和 tRNA 等)的合成(Hosoda 等，1963)。五龄幼虫后丝腺早期发育的RNA代谢与后期的 RNA 代谢有质的差异，五龄第六天，rRNA 合成减少而 mRNA 合成增加(Miura, 1965)；在整个五龄期中，后丝腺中丝心蛋白 mRNA 的合成速率是恒定的(7—10 分子/每分钟基因)，其他的 RNA 合成都逐渐减少，此时，rRNA 的合成率从 7 分子/每分钟基因下降至 0.2 分子/每分钟基因；到五龄第七天，单个丝心蛋白基因的转录速率却比 rRNA 基因高50倍(Suzuki 等，1976)。至五龄末期，丝心蛋白 mRNA 含量约占细胞中RNA 的3.5%，而五龄期的丝心蛋白 mRNA99%都是在五龄期中合成的(Suzuki 等，1974)。由 mRNA 串

起来的多核糖体是蛋白质合成的场所，丝蛋白的合成也是在这种有组织的多核糖体中进行的（Kobayashi 等，1966）。我们的试验结果表明，保幼激素类似物 3 号对家蚕后丝腺的 RNA 合成有促进作用，由于 RNA 含量增高是在五龄第六天之后，因此，我们推测，激素的作用可能主要是使丝心蛋白 mRNA 合成率提高，即加快了丝心蛋白基因信息的转录，从而增强丝蛋白合成的能力，达到增产蚕丝的效果。

2. 关于 DNA 家蚕幼虫期的丝腺约有 1000 个细胞，它们在整个幼虫期中长得很大而无细胞分裂；每个细胞核随着日龄增长逐渐分叉，染色质和核仁在数量上和体积上均明显增大（Ono, 1942）。丝腺细胞内的 DNA 和 RNA 含量（分别为 1 微克和 4 微克）均比一般细胞的含量高，这反映它们发生多倍化现象（Chinzei, 1972）。幼虫五龄期第五天，细胞中弥散的染色质里有新的 DNA 的合成（Akai, 1965），丝腺细胞的多倍化最少是单倍体精子基因的 4×10^5 倍（Gage, 1974），而我们测得每个丝腺细胞约含有 0.6—0.8 微克 DNA，同时推算出此值为家蚕单倍体染色体组（0.5 微微克 DNA）的一百万倍。

家蚕丝腺细胞 DNA 的复制方式和家蚕体细胞染色体组的复制方式是一样的，家蚕不同组织来源的 DNA，其核苷顺序没有什么区别，各种组织的 DNA 在氯化铯溶液梯度的浮力密度一样（Gage, 1974）；丝腺细胞的 DNA 与丝心蛋白 mRNA 互补核苷顺序的多寡和体细胞 DNA 与丝心蛋白 mRNA 互补顺序的多寡也是一致的，杂交作用饱和实验的结果指出，丝腺细胞 DNA 与丝心蛋白 mRNA 同源的只占0.0022%，和体细胞的一样，说明后丝腺中丝心蛋白的大量合成并非由于特异基因的放大作用（Suzuki 等，1972）。根据丝心蛋白 mRNA 分子的大小、染色体组的 DNA 含量和杂交饱和值表明，每一家蚕单倍体染色体组，只含有一个丝心蛋白基因，在这种情况下，借稳定的丝心蛋白 mRNA 的异常的翻译能力（25,000 mRNA 分子/基因，100,000蛋白质分子/mRNA），家蚕幼虫在五龄期中合成大量的丝蛋白仍然是可能的（Gage, 1976）。我们的试验结果初步表明，保幼激素类似物 3 号增产蚕丝的作用是通过增加合成 RNA，即对转录过程的调节而达到的。

3. 关于保幼激素的作用 保幼激素作用于细胞核方面的报告指出，激素处理核的 RNA 比正常对照核的 RNA 有与 DNA 杂交更高的能力，说明激素对细胞中染色体组有特殊的效应，似能引起某特定部位基因的转录（Congote 等，1970）。Akai 等（1971）用另一种保幼激素类似物（甲基 10,11-氧化3,11-二甲基-7-三癸乙基-2, 6-二烯盐）处理家蚕五龄幼虫，以 ^{3}H-尿嘧啶和 ^{3}H-甘氨酸分别标记后丝腺的 RNA 和蛋白质，用自显影的方法测定，结果发现经激素处理的丝腺细胞，其 RNA 银粒含量比未处理的细胞多，说明该类似物有刺激家蚕后丝腺中 RNA 合成的作用。我们的试验结果同样表明，保幼激素类似物 3 号促进 RNA 合成的增加。

关于保幼激素对 DNA 合成的作用，有报告指出，保幼激素抑制蚱蜢（Melanoplus）胚胎发育中的卵裂和 DNA 合成（Rao 等，1974），同时，保幼激素及其类似物对家蝇和丽蝇（*Calliphora*）成虫器官芽细胞的DNA合成同样有抑制作用（Logan 等，1975; Vijverberg 等，1976）。从我们的试验结果也可以明显地看出，保幼激素类似物 3 号抑制后丝腺细胞中 DNA 的合成活动。这都证明，保幼激素直接作用于遗传物质，然而，激素究竟如何对遗传物质起作用，至今尚未彻底明了。

参　考　文　献

郭　郛等　1978　家蚕丝蛋白的合成和保幼激素的调节。科学通报(待发表)。

Akai, H. *et al.* 1965 Incorporation of labelled thymidine into the silk gland of the silkworm *Nature* **206**:847—8.

Akai, H. *et al.* 1971 Increased accumulation of silk protein accompanying JH-induced prolongation of larval life in *Bombyx mori L. Appl. Entomol. and Zool.* 6(4):218—20.

Burton, K. 1956 A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.* **62**:315—23.

Congote, L. F. *et al.* 1970 On the mechanism of hormone action XVIII. Alteration of the nature of RNA synthesized in isolated fat body cell nuclei as a result of ecdysone and juvenile hormone action. *Z. Naturforsch.* **25**b:279—84.

Chinzei, Y. *et al.* 1972 Nucleic acid changes in the whole body and several organs of the silkworm, *Bombyx mori* L. during metamorphosis. *J. Inect Physiol.* 18(9):1683—97.

Gage, L. P. 1974 Polyploidization of the silk gland of *Bombyx mori. J. Mol. Biol.* **86**(1):97—108.

Gage, L. P. 1976 Determination of the multiplicity of the silk fibroin gene and detection of fibroin gene-related DNA in the genome of *Bombyx mori. J. Mol. Biol.* **101**(3):327—48.

Hosoda, J. *et al.* 1963 Ribonucleic acid metabolism in the posterior silkgland of silkworm, *Bombyx mori.* during the fifth instar. *Biochem. Biophys. Acta* **72**: 544—54.

Kobayashi, T. *et al.* 1966 Polyribosomes in the posterior silkglands of silkworm. *J. Biochem. Tokyo* **60**:578—85.

Logan, W. *et al.* 1975 Effects of ecdysone and juvenile hormone on DNA metabolism of imaginal disks of *Drosophila melanogaster. J. Insect Physiol.* **21**(7):1343—54.

Miura, Y. *et al.* 1965 Studies on the protein synthesis in silk glands VI. RNA metabolism during fifth instar larvae. *J. Biochem. Tokyo* **58**:293—9.

Ono, M. 1942 Cell numbers in the silk gland of *Bombyx mori* larva. *Res. Rep. Kagoshima Tech. Coll. Japan* **14**:123—56.

Richards, G. M. 1974 Modifications of the diphenylamine reaction giving increased sensitivity and simplicity in the estimation of DNA. *Anal. Biochem.* **57**(2):369—76.

Rao, K. D. P. *et al.* 1974 Effect of juvenile hormone on DNA synthesis during embryogenesis in *Acheta domesticus. Wilhelm. Roux' Arch. Entwicklungsmech. Org.* **174**(3):276—84.

Suzuki, Y. *et al.*, 1972 The genes for silk fibroin in *Bombyx mori. J. Mol. Biol.* **70**:637—51.

Suzuki, Y. *et al.* 1974 Quantitative measurements of fibroin messenger RNA synthesis in the posterior silk gland of normal and mutant *Bombyx mori. J. Mol. Biol.* **88**:393—407.

Suzuki, Y. *et al.* 1976 Accentuated expression of silk fibroin genes in vivo and in vitro. *J. Mol. Biol.* **107**(3):183—206.

Tashiro, Y. *et al.* 1968 Studies on the posterior silk gland of the silkworm, *Bombyx mori.* I. Growth of posterior silk gland cells and biosynthesis of fibroin during the fifth larval instar. *J. Cell Biol.* **38**(3):574—88.

Vijverberg, A. J. *et al.* 1976 Juvenile hormone and DNA synthesis in imaginal disks of *Calliphora erythrocephala*: results of a new incubation technique. *J. Insect Physiol.* **22**(2):181—7.

EFFECTS OF A JUVENILE HORMONE ANALOGUE ON NUCLEIC ACID METABOLISM OF THE POSTERIOR SILK GLAND IN SILKWORM *BOMBYX MORI* L.

WU TSIU-NGUN HU CHAO-YUAN QUO FU

(Institute of Zoology, Academia Sinica)

(1) J003(1-(p-ethylphenoxy)-7-methoxy-3, 7-dimethyl-2-octene) stimulates RNA synthesis of the posterior silk gland cells.

(2) During the fifth instar of the normal larvae, the DNA content of posterior silk gland cells gradually increases and different races of the sikworm show couspicuous difference in this respect.

(3) J003 inhibits DNA synthesis in the posterior silk gland cells, and the degree of inhibition shows some relation with the increase of dosage used.

(4) Our preliminary results give evidence showing, the increase of silk protein secretion in the silk gland after treatment with J003 was due to the changing rate of the transcription during fibroin synthesis.